

Contents

[illegible]
$$\frac{8}{24}$$

24

ちなみによ
EcoRIを使うのは
優秀で、ちゃんと
切ってくれるから

生物時計回路のこれから。

λ phage の $7 \mu / \mu$ が 25 日ぐらいに届くそうです。

振動させるときのコンストラクト

○ $cI \sim cII \in p15A = \lambda\psi_2$ (infusion)

便のポリシー

$$\begin{cases} F-E-7M-c2+cI \neq 0 \\ F-E-7M+1acI-cI+c2-3 \end{cases} \quad \leftarrow \text{「たか」の値かという点、} \frac{1}{4} \text{ 以上は } cI \rightarrow cI \text{ の向きに、} \lambda, \gamma \text{ かわり得る}$$

vector $P_{1.7M} \wedge E \times z'' \text{ to } z \text{ axis}$.

$$\lambda_{acI} \approx \lambda_{TC}$$

• lacI is double terminator :- 143

Ex 5. 2" 47.7 λ 432 nm 1112" 650.

P1. 7L a E PCR U7 P1,23L 12.

$$\begin{cases} F-E-9M-lacI+tag.5' \\ F-S-7M-tag+lacI=3' \end{cases}$$

- $[ac] + \text{terminator} \in E$ & $\exists \tau'' \neq \tau$.

$p1 \sim M \wedge \lambda \psi z.$

これできたら $cI \sim cII$ を入れることが出来る。(あ、書き方順番逆でしたね。)

- $O_L \sim N_E$, $P \subset R$, $\text{UT } p15A_{11}$ in fusion $2'' \times 4''$

1 F - E - 9M - N + OL - 5'

$$F - S - 9M - 0L + N - 3'$$

2nd PI, 7M to 2nd. Ex Section.

- cI , $c \in \mathcal{O}$ と χ'' について \bar{b} .

また、このように p15A と ColE1 に入れる。

GFP_κ. araC_用 lacI_用

- λ かつ τ は、 z かつ z'' かつ $NcoI$ と $XbaI$ の切、 τ .

GFP, *araC*, *lacI* & infection λ 43.

- $GFP \vdash \text{draC} \notin \rightarrow \{2, 1\}^3_0$ ($\tau_0, \tau_{v1}, \tau_3$)

＜10-ツの長士＞

cI ~ cII : 1426 bp

N = ~ 450 bp

c III = 164 bp

動脈硬化班のこれから。

今まで LDR と思っていたものは、^{これは25日とどくはず} どうやら変なものみたいなので新しいプライマーをたのみました。(2500bp はずなのに、3000bp くらいにさすがにちがうよね。) 1%ゲルでも bp が多いと分離がうまくいかないの、まちがったのでしょうか。
で、このプライマーというものは LDR の周りにくっつくように設計してあります。(そうすると、GC 少し減るのよ) これで LDR を増やすと共に、本当にもらった cDNA は、全長入ってるものなのかを同じプライマーでシーケンスをしたらと良いでしょう。
あと、- 応 ~~Gad1 promoter~~ へ YCplac111 に LDR を入らそう。なってます。田中さんが、これなら Lab にあるから使えよっておっしゃいました。これは promoter 何かは私はまだしらへません。添付のプリントを見てさかして下さい。あと、MCS に EcoRI とかがあって、クイックチェンジしないといけません (パーツ登録には。)

7バコ 111E のこれから。

でか、25日やってほしいことしか書けないですか。

YgiT + terminator のシーケンス解析を行ってほしいです。

酵母だと、terminator いらないけど、パーツ登録する用にね。

10月25日のこれから。

8/24 僕はあんぱんが好きです。(3分) 兄さん、おめでとう。

(3分)

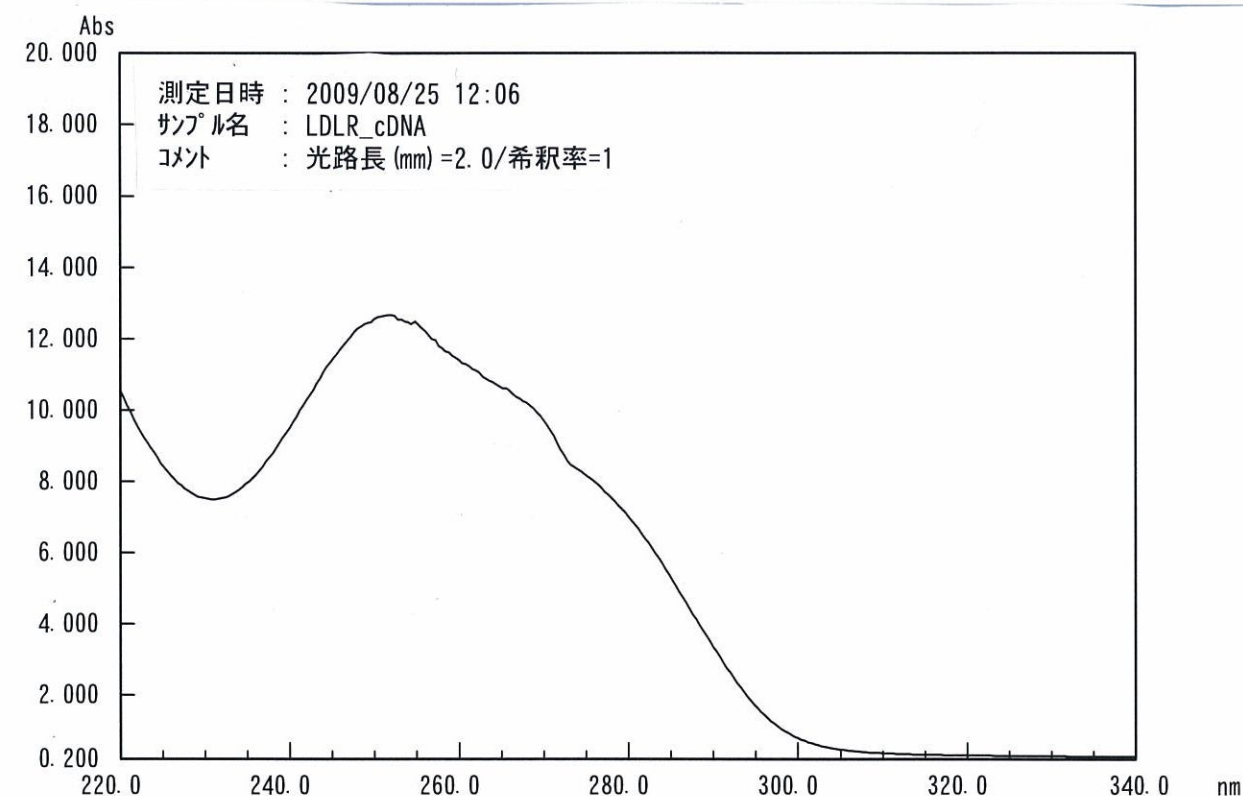
8/25

山本 10:00-

山崎 12:00-

山本 1:00-

山崎 3:00-



計算結果

230.0 (nm)	260.0 (nm)	280.0 (nm)	320.0 (nm)	Ratio	Conc (ug/mL)	Pure (%)	P. Conc (mg/mL)	M. Conc (uM)
7.521	11.403	7.011	0.309	1.655	554.70	92.0	1.957	25.329

① LDLR. 新たなプライマーを使ってもう1度クローニング。

・全長 ~2500bp

・プライマー

40625874-002 09/08/25
F.P. Op. LDLR out 3' 41mer
5' AGTGGTCTCTTGGCTCTGAGAGG
GGACTCCAGGAGATGTT3'

MW: 12608.28 (OD: 8.00)
(TW: 240.3) (TA: 19.1)
(TE: 190.6) (TM: 71.6)

40625874-001 09/08/25
F.S. Op. LDLR out 1.5' 34mer
5' CACCATGGAGAGTACTGGCAGAG
GCTGGAGGAT3'

MW: 10541.93 (OD: 8.00)
(TW: 222.6) (TA: 21.1)
(TE: 211.2) (TM: 70.2)

・Pfu-Ultra

① 95°C 2min

95°C 30sec

45°C 10sec

72.5°C 1min

↓

95°C 30sec

65°C 10sec

72.5°C 1min

25°C ∞

↓

※今までとプライマーが違っているので、2種類の

↓

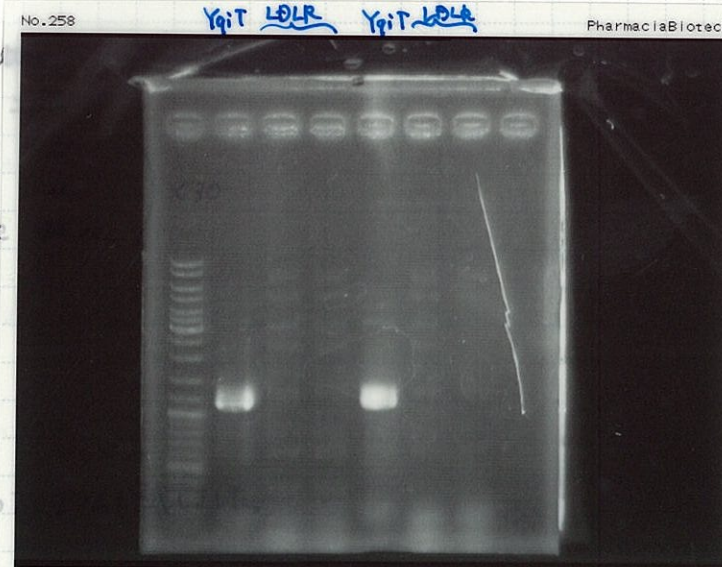
ポジコン (YqiT) は増えた → Pfu Ultra は元々

非特異的に色々な長さのものが増えている → 次回、アニーリング温度を 56°C - 60°C くらいで

色々な条件を試す。最初は 20μl でやって

一回 2500bp 付近のものをゲルで切出す。

ゲル
マーカー YqiT LDLR YqiT LDLR
707734 ① 707734 ②



LDLR の Pfu Ultra 2 の 70-27

<100μl> × 2

2μl 5' primer

2μl 3' primer

16μl dNTP

20μl Pfu buffer < 2μl 100× DMSO

152.5 154.5μl MQ

0.5μl cDNA LDLR2 tapping

5μl Pfu Ultra 2

② LDLR の cDNA が ちゃんと 全長あるかどうか シーケンス (準備)

LDLR cDNA 5'

" " 3'

YqiT 5'

" " 3'

} ホジゴンとして

1.5ml イッペン

9μl B.D.3.1 buffer

2μl B.D.3.1

31.5μl MQ



8連 イッペン

◦ LDLR cDNA2 → 0.3μl, MQ で 1μl に mess up.

◦ YqiT → 0.6μl, MQ で 1μl に mess up.



~~3' / 5' primer~~

3' / 5' primer 0.5μl

* 8.5μl



B.D. の プログラム で PCR



明日 シーケンス

8連 イッペン → -20℃. LDLR 新 5' 以降 にあります

1 2 3 4 5 6 7 8

LDLR5' ↑ YqiT5' ↑

LDLR3' YqiT3'

8/26 にするこ

• cIII の プライマー 設計 (in fusion 用). (P1.7M と fusion させ)

• LDLR の シーケンス

• LDLR の PCR の 条件 検討 → プログラム ④ で. 55℃ を 23 (7-17) と 56℃, 57℃, ..., 60℃ で 行, り みる.

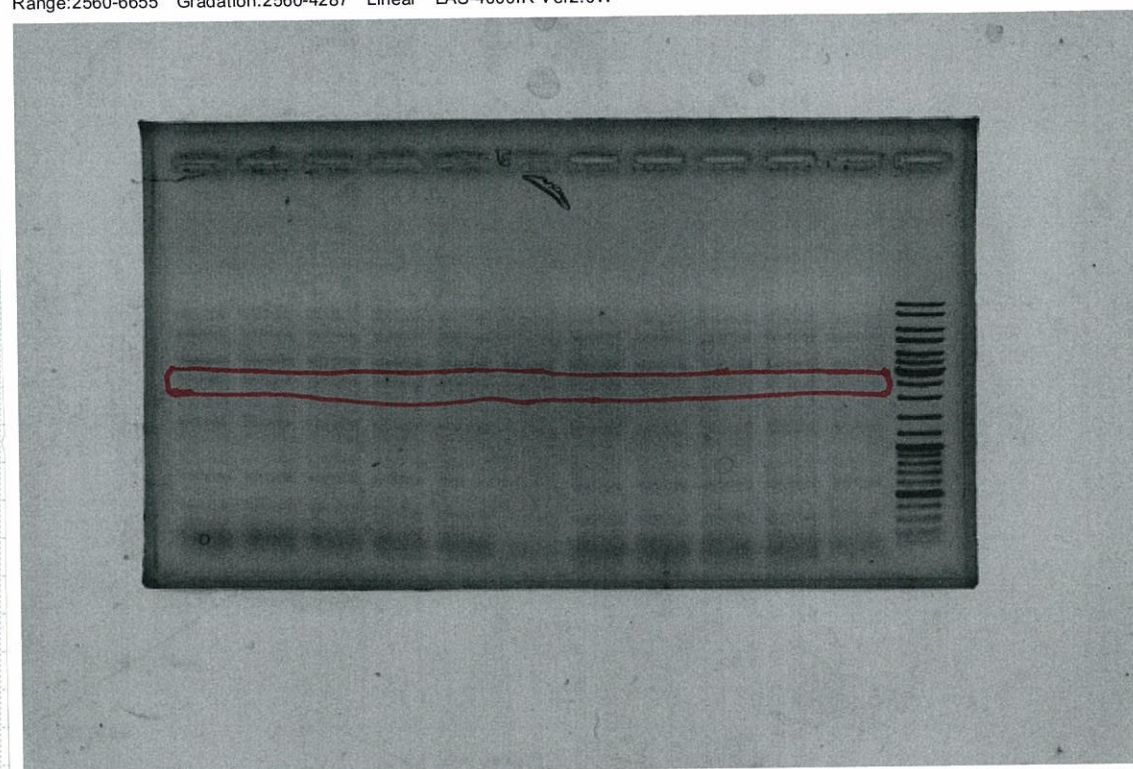
• YqiT + terminator の シーケンス 準備. ← プライマー が 届いた。

• cI ~ cII, lacI, araC, N など. PCR

↑ ~~増やして~~ 増やして ほしい 順に. lacI, cI ~ cII, N, araC,

LDLR. 7' 切出し 前

Aug Tue 25 19:04:32 2009 LAS-4000#7662211 FUJINON VRF43LMD Cooling:-25 C
Full Precision High Resolution 10sec EtBr Fluoro B Tray Position 2
Range:2560-6655 Gradation:2560-4287 Linear LAS-4000IR ver2.0W



切出し 後

Aug Tue 25 19:24:10 2009 LAS-4000#7662211 FUJINON VRF43LMD Cooling:-25 C
Full Precision High Resolution 10sec EtBr Fluoro B Tray Position 2
Range:2560-6655 Gradation:2560-3935 Linear LAS-4000IR ver2.0W

